

**RACIONALIDAD DE LA INVESTIGACIÓN CON CÉLULAS TRONCALES
EMBRIONARIAS.**

RATIONALITY OF THE INVESTIGATION WITH EMBRYONIC MAIN CELLS.

Natalia López Moratalla

Departamento de Bioquímica. Universidad de Navarra

Edificio de Investigación. c/Irunlarrea, s/n. 31008 Pamplona. Teléfono: 948 425600 ext. 6318

Fax: 948 425649 E-mail: natalialm@unav.es

Palabras clave. Células troncales embrionarias. Células del tipo embrionario. Transferencia nuclear. Clonación.

Resumen

Las “células troncales de origen embrionario” (ES) tienen capacidad de crecimiento y la información genética de las células de un embrión temprano. No son aptas para uso terapéutico y además no se ha logrado una tecnología eficiente para aislarlas, cultivarlas y mantener estables las líneas celulares derivadas de ellas, por lo que carecen también de interés para investigación. En todo caso, carece de justificación ética el empleo de embriones humanos como fuente de obtención de las células hES, ya que es un grave mal destruirlos tanto si son viables, como si no. Es también un mal tomar una biopsia, incluso sin riesgo para el embrión, de la cual derivar células hES porque es una manipulación que no va en beneficio de la vida y salud del embrión. Y, es un mal, aunque menor, usar con este fin los embriones muertos a consecuencia de la práctica de la fecundación *in vitro*.

Actualmente se trata de conseguir “células troncales del tipo embrionario”, que no procedan de embriones, pero con las características de crecimiento y diferenciación pluripotencial de las ES y una dotación genética elegida. El procedimiento principal es reconstruir óvulos por transferencia nuclear sin reprogración genética. Incluso con garantías de que no se generara un individuo clónico, esta tecnología supone una manipulación injustificada de mujeres para obtener los óvulos. Una alternativa al uso de embriones y óvulos, es rejuvenecer la célula somática, bien introduciendo en ella los componentes moleculares que efectúan la reprogramación, o bien dándole capacidad de multiplicarse mediante ingeniería genética.

Is it reasonable to carry out research with embryonic stem cells?

Summary. Embryonic stem cells (ES) have the capacity to grow and keep genetic information of cells corresponding to an early embryo. They are not adequate to cure; and up to now no efficient technology allows them to grow or keep stable cell lines derived from them. Their research value is indeed very limited. Besides no ethical reasons could justify the preparation of human embryos with the purpose of destroying them, be they viable or not. It is also unacceptable to perform a biopsy, even if protection of the embryo is intended; that would be a manipulation not directed to the life or health of the embryo. Using embryos already dead as a consequence of IVF is also an evil, although more limited. Some specialists are trying to prepare stem cells of embryonic type, although not derived from embryos, and preserving the features of ES such as capacity to grow and differentiate as pluripotent cells and with a chosen and selected genetic makeup. The main procedure tries to rebuild an egg after transferring into it a nucleus without genetic reprogramming. They even try to ensure that a clonic individual would not be generated. It should be clearly stated that this technique makes an unjustifiable use of women to obtain from them the egg cells. An alternative to the use of embryos and eggs is the attempt to dedifferentiate a somatic cell through the introduction of components causing reprogramming, or else inducing cell proliferation through genetic engineering.

1. Introducción.

La racionalidad de los trabajos con células madre de origen, o de tipo, embrionario exige dar cuenta no sólo de la lógica de la investigación aplicada a la biomedicina y biotecnología, sino también de la ética que conlleva la manipulación de la vida humana y su transmisión. La cuestión fundamental, por ser previa a todo juicio ético acerca de los procesos y finalidades en juego, es conocer con rigor los datos reales que permitan argumentar con profundidad y verdad:

A) Qué es exactamente el *material* de partida que se manipula; ¿cuál es su entidad real y si el nombre que se le da le corresponde?

B) En qué consiste la manipulación sobre *ese material* de partida: ¿qué tipo de realidad se obtiene con *ese* proceso sobre *ese* material? ¿La entidad artificialmente obtenida es de una nueva naturaleza y debe, por ello, ser denominada de modo diferente o, por el contrario, se trata de la misma entidad que obtiene la naturaleza por sus propios procedimientos?

C) Al tratarse de manipulaciones de la vida incipiente hay que tener presente además la especie a que pertenece. Los mecanismos básicos generales son iguales en los procesos biológicos de las diferentes especies de mamíferos; ahora bien, para llevar a cabo una manipulación concreta *lo que se hace* en un individuo de una especie puede ser necesario, pero insuficiente, en el caso de uno de otra especie más compleja. Es sabido que en los primates, la misma complejidad del desarrollo orgánico, produce, de forma natural, barreras a las manipulaciones y que dichas barreras naturales dificultan la intervención. Por el contrario esas barreras no existen en otros mamíferos, o al menos son más lábiles y pueden saltarse artificialmente.

Analizadas con rigor estas cuestiones podrá hacerse el juicio ético acerca de cómo afecta una manipulación concreta a la vida humana incipiente y a su transmisión. Las presiones ideológicas, políticas y económicas son muy fuertes en este campo y hacen difícil conocer de qué se trata. Tanto la comunicación científica como la divulgación están sometidas a profundos prejuicios y, por ello, es fundamental el rigor de la terminología.

La Medicina Regenerativa investiga posibles protocolos o productos terapéuticos celulares que permitan regenerar células destruidas por enfermedad o accidente. Es obvio que nunca estará justificado destruir un ser humano para conseguir sus células troncales, aunque con ello se sanaran otros. Ahora bien, al plantear alternativas reales a la búsqueda de células no es suficiente evitar destrucción o alteración de vidas humanas sino hay que velar también que no haya manipulaciones de la corporalidad de mujeres para obtener gametos. Tendrían que darse

circunstancias muy excepcionales para que fuera éticamente correcto promover la donación de óvulos.

1.1. Células madre de origen embrionario y células madre del tipo embrionario.

Es preciso tener en cuenta que con el término “células madre embrionarias” nos referimos a dos realidades diferentes. Inicialmente el término se aplicó a las células extraídas de la masa interna de un blastocisto (embrión humano de cinco días) generado por fecundación. Estas “células madre de origen embrionario” (ES) por su propia naturaleza, han resultado incontrolables y, hoy por hoy, no hay datos que permita afirmar que van a poder usarse para transferirlas a enfermos con el objetivo de que sustituyan a las células que se han dañado, o perdido. Son muy inmaduras, tienen frenada la diferenciación y activado el crecimiento, debido a que la información genética es la propia de las células de un embrión temprano.

Actualmente la investigación se dirige a conseguir artificialmente una segunda clase de células. Las “células madre del tipo embrionario” con dotación genética de una célula madura elegida. Estas células tienen en común con las de origen embrionario algunas de las propiedades: inmadurez, capacidad de multiplicación indefinida y de generar una progenie de células especializadas de distintos tipos. Los procedimientos de fabricación de estas entidades artificiales son, en principio, tres: a) transferencia nuclear a un óvulo (células ntES); b) activación partenogénica de un óvulo, y c) fusión de células o transferencia al citoplasma de factores de rejuvenecimiento celular. Pero, y esto es importante, la información genética humana que poseen no es la de un embrión precoz producido por fecundación de un gameto femenino y otro masculino, sino la correspondiente al núcleo que procede de la célula elegida. La información genética no es, por tanto, la de una “célula madre de origen embrionario”. En cualquiera de los casos se requeriría todo un proceso de reprogramación genética para dar lugar a un cigoto que se desarrolle como embrión.

Lo que se “reprograma” con los factores citoplásmicos del óvulo (o en su caso de la célula fusionada) es la información para organizarse de modo similar a la organización de un embrión temprano, pero no lo es. Una cuestión es que pudiera llegarse a producir artificialmente un embrión humano clónico o partenogénico y otra diferente es que lo conseguido hasta ahora lo sea.

Conviene tener presente que una realidad viva (un individuo o un mero conjunto celular) no se define ni sólo por los genes ni solo por el medio. El fenotipo resultante depende de ambos. Ahora bien ambos niveles no tienen igual función en la constitución de la realidad viva, sea natural o sea artificial. Los genes aportan la identidad específica de especie a que

corresponde, mientras que el medio determina el estado de actualización de esa información genética y con ello el fenotipo real del resultado final del proceso. Ambos tipos de células madre (de origen o de tipo embrionario) son realidades distintas y tienen propiedades diferentes (no sólo por su origen sino por lo que son) y deben distinguirse tanto para un análisis ético, como en un análisis técnico puesto que las posibilidades de utilidad en investigación y sus aplicaciones son diferentes. En ambos casos lo que comparten es que son células troncales, en cuanto que no están diferenciadas a término y crecen.

La base del interés científico de los estudios con células troncales embrionarias es la posibilidad de conocer los procesos que gobiernan la diferenciación celular para generar la variedad de fenotipos celulares de un organismo. Se pensó, inicialmente, que a partir de esos conocimientos se podrían dirigir estos procesos para originar cultivos celulares, o cultivos de tejidos *in vitro*, que pudieran sustituir *in situ* a los tejidos dañados por procesos patológicos, desarrollando las correspondientes aplicaciones médicas de estas investigaciones.

Sin embargo, y como describiremos a continuación, no se han superado aún las dificultades técnicas para el cultivo *in vitro*, para dirigir la maduración al tipo deseado y mantener sin cambio estas células madre, especialmente de las de origen embrionario, precisamente por el estado inmaduro de su genoma.

2. El potencial uso terapéutico de las células troncales de *origen* embrionario (hES) es sólo una hipótesis.

La idea inicial fue conseguir células madre embrionarias que crecieran indefinidamente y que pudieran ser “inmortalizadas” como líneas celulares comercializables, o disponibles libremente desde los correspondientes bancos. A partir de ellas podría inducirse a diferenciarse y madurar, e incluso llegarían a formar tejidos, o islotes pancreáticos, utilizables en transplantes. La gran ventaja que se supuso que tendrían frente a las células troncales de adulto es la cantidad a disposición. A finales de 2005 el abordaje, que consiste en dirigirlas hacia el tipo celular deseado para poder transferirlas al organismo para una Terapia regenerativa, ha resultado imposible. El avance de los conocimientos ha mostrado dos cuestiones importantes que dan cuenta de que esta estrategia terapéutica no será posiblemente factible. Por una parte la construcción de un órgano o tejido es un proceso epigenético que autorregula la propia organogénesis regulando la proliferación de las células inmaduras¹; es decir, la organización multicelular es el resultado de un proceso activo que regula el

¹ Nelson, C.M., Jean, R.P., Tan, J.L., Liu, W.F., Sniadecki, N.J., Spector, A.A., Chen, C.S. "Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics". *PNAS*, 102, (2005), 11594-11599.

crecimiento tisular según el patrón de la morfogénesis, en plena dependencia del entorno y muy difícilmente reproducible artificialmente. Más aún un trasplante de células inmaduras tiene, según el tejido de que se trate, una ventana de tiempo específico en que cede el crecimiento para poder diferenciarse *in situ*². La idea inicial de un proceso *in vitro* desde células troncales de origen embrionario a un tejido o órgano para trasplante ha resultado no sólo muy complejo sino “necesitado” en buena medida de llevarse a cabo *in vivo*.

Por otra parte, en los mismos años ha sido posible el abordaje inverso: inducir a las células troncales del organismo a que cumplan su función. El problema de la “cantidad” de células disponibles, escaso en algunos casos, se ha resuelto mediante ingeniería genética; concretamente se ha logrado que células humanas β -pancreáticas crezcan controladamente y además induzcan tolerancia, de tal modo que transferidas a ratón modelo de diabetes tipo 1 humana, han corregido la enfermedad³.

2.1. No se ha logrado una tecnología eficiente para aislar, cultivar las células ES y mantener estables las líneas celulares derivadas de ellas.

Varios trabajos han puesto de manifiesto las dificultades, hasta ahora invencibles, de “domesticar” las células troncales de origen embrionario. Existen una serie de factores que limitan, de hecho, el desarrollo de terapias regenerativas basadas en estas células⁴, y sigue siendo un reto producir tipos celulares maduros, funcionales y puros de células hES que pudieran ser utilizadas para trasplantes.

a) En primer lugar, es necesario poder llegar a sustituir el lecho de células inmaduras (generalmente fibroblastos de ratón) en el que crecen, ya que se corre el riesgo de transferir agentes patógenos. En los intentos de sustituir el lecho de células por una matriz no biológica faltan los componentes para crecer que las células les aportan.

b) En segundo lugar, después de un crecimiento a largo plazo, presentan una diferenciación impredecible; incorporan productos de origen animal (N-gliconeuuranímico) a los componentes de la membrana, y esta modificación química potencia su capacidad antigénica y con ello la producción de rechazo inmune⁵.

² Eventov-Friedman, S., Katchman, H., Shezen, E., Aronovich, A., Tchorsh, D., Dekel, B., Freud, E., Reisner, Y. "Embryonic pig liver, pancreas, and lung as a source for transplantation: Optimal organogenesis without teratoma depends on distinct time windows". *PNAS*, 102, (2005), 2928-2933.

³ Narushima, M., et al. "A human β -cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes". *Nature Biotechnology*. (2005). Doi:10.1038/nbt1145.

⁴ Stojkovic, S., Lako, M., Strachan, T., Murdoch, A. "Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells". *Reproduction* 128, (2004), 259-267.

⁵ Martin, M.J., Montri, A., Gage, F., Varki, A. "Human embryonic stem cells express an immunogenic non-human sialic acid". *Nature Methods* 2, (2005), 164-165; Martin, et al. "Stem cell culture shock". *Nature Medicine*, 11,

c) Expresan moléculas que activan la respuesta inmune durante su diferenciación por desregulación de las moléculas del sistema HLA-I⁶.

d) Además, las líneas celulares hES han demostrado tener una gran inestabilidad genética⁷. Sufren alteraciones cromosómicas y mutaciones en el material genético y adquieren alteraciones epigenéticas, asociadas en algunos casos con el desarrollo de tumores, como son cambio en el número de copias de genes o de la metilación de los promotores⁸.

La situación de los bancos de células madre a diciembre de 2005 es la siguiente⁹. El banco más desarrollado es el "UK Stem Cell Bank" en el National Institute for Biological Standards and Controls en Potters Bar, cerca de Londres. Iniciado en Septiembre de 2002, y fundado por el Medical Research Council y el Biotechnology and Biological Sciences Research Council en enero de 2003, proyecta ser un reservorio de todos los tipos de células troncales humanas. En octubre de 2005, tenían 24 líneas pero ninguna disponible para ser usada lo que probablemente pueda conseguirse en el 2006, según su director Glyn Stacey. Otra iniciativa en marcha es el "US National Stem Cell Bank" que se situará en el WiCell Research Institute, en Madison, Wisconsin; cuenta con una dotación 16.1 millones de dolares a cuatro años, de los National Institutes of Health. Podrá adquirir, almacenar, caracterizar y distribuir las líneas ES humanas para las que se han aprobado el uso de fondos federales. En Edinburgo, el brazo Europeo del "Stem Cell Sciences" de Melbourne de Australia, ha desarrollado células troncales neurales (NS) similares a las NS encontradas *in vivo* y derivadas tanto de ES como de fetales y tejido cerebral de adulto. Intentan generarles mutaciones genéticas y pueden ser útiles en investigación biomédica para prebas *in vitro* de fármacos. R&D Systems of Minneapolis, Minnesota ofrece "preparadas para usar" células primarias corticales derivadas de embriones de ratas y el kits que les permite crecer. Pueden diferenciarse en astrocitos, neuronas y oligodendrocitos. Se ha aprobado un centro en la Universidad de Granada de España y otro en Corea del Sur.

(2005), 228-232; Ebert, J. "Human stem cells trigger immune attack". *News Nature*. Published online: 24 January 2005; doi:10.1038/news050124-1.

⁶ Drukker, M., Benvenisty, N. "The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells". *Trends in Biotechnology* 22, (2004), 136-141; Kim, J.Y., Kim, D., Choi, I., Yang, J.S., Lee, D-S., Lee, J.R., Kang, K., Kim, S., Hwang, W.S., Lee, J.S., Curie, A. "MHC expression in a human adult stem cell line and its down-regulation by hCMV US gene transfection". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, (2005), 69-78.

⁷ Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Shariki, K., Laevsky, I., Coleman, R., Itskovitz-Eldor, J. "Human feeder layers for human embryonic stem cells". *Biology of Reproduction*, 68 (2003), 2150-2156; Carpenter, M.K., Rosler, E.S., Fisk, G.J., Brandenberger, R., Ares, X., Miura, T., Lucero, M., Rao, M.S. "Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system". *Developmental Dynamics* 229, (2004), 243-258.

⁸ Maitra, A., Stojkovic, S., Lako, M., Strachan, T., Murdoch, A. "Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells". *Reproduction* 128, (2004), 259-267.

⁹ Cfr. Nature, Vol 438, 1 December, 2005.

Una nueva compañía pretende diseñar nichos celulares y desarrollar células para ofrecer servicios de chequeo a industrias farmacéuticas y biotecnológicas a partir de mediados de 2006; es la “Cellular Dynamics International (CDI) de Madison, Wisconsin, fundada entre otros por el pionero de las ES James Thomson,

2.2. Los experimentos realizados en modelos animales ponen de manifiesto que las células troncales de origen embrionario no son aptas para uso terapéutico.

Las células hES se han podido diferenciar a tipos específicos como neuronas¹⁰, células hematopoyéticas¹¹, endoteliales¹² y cardiomiocitos¹³. Diversos estudios con modelos animales sugirieron la posibilidad de usar estas células para terapia¹⁴. Sin embargo, ese uso está impedido por la posibilidad de rechazo inmune y, sobre todo, por el hecho de que inducen la formación de tumores¹⁵ cuando se transfieren al organismo. El potencial tumorigénico de las ES se reduce cuando se pre-diferencian *in vitro*. Precisamente, por su intensa capacidad de crecimiento se hace muy difícil manipularlas; no hay seguridad de poder inducir la diferenciación a término de todas ellas y si permaneciera presente alguna de las indiferenciadas, entre las células que se transplantan directamente a un animal, inducirían el crecimiento tumoral¹⁶.

¹⁰ Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., et al. "Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, (2004), 12543–12548; Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M.F., Reinhartz, E., et al. "Neural progenitors from human embryonic stem cells". *Nat Biotechnol* 19: (2001), 1134–1140; Zhang, S.C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brustle, O., Thomson, J.A. "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells". *Nat Biotechnol* 19, (2001), 1129–1133.

¹¹ Kaufman, D.S., Hanson, E.T., Lewis, R.L., Auerbach, R., Thomson, J.A. "Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, (2001), 10716–10721.

¹² Levenberg, S., Golub, J.S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Langer, R. "Endothelial cells derived from human embryonic stem cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 99, (2002), 4391–4396.

¹³ Mummery, C., Ward-van Oostwaard, D., Doevendans, P., Spijker, R., van den Brink, S., et al. "Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: Role of coculture with visceral endoderm-like cells". *Circulation* 107, (2003), 2733–2740.

¹⁴ Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., Lindvall, O. "Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke". *Nat Med* 8, (2002), 963–970; Björklund, A., Lindvall, O. "Cell replacement therapies for central nervous system disorders". *Nat Neurosci* 3, (2000), 537–544; Isacson, O., Deacon, T.W., Pakzaban, P., Galpern, W.R., Dinsmore, J., Burns, L.H. "Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres". *Nat Med* 1, (1995), 1189–1194; McKay, R. "Stem cells—hype and hope". *Nature* 406, (2000), 361–364; Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A.C., Segal, M., McKay, R.D. "Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*". *Mech Dev* 59, (1996), 89–102; Savitz, S.I., Rosenbaum, D.M., Dinsmore, J.H., Wechsler, L.R., Caplan, L.R. "Cell transplantation for stroke". *Ann Neurol* 52, (2002), 266–275.

¹⁵ Erdö, F., Bührle, C., Blunk, J., Hoehn, M., Xia, Y., Fleischmann, B., Föcking, M., Küstermann, E., Kolossov, E., Hescheler, J., Hossmann, K.A., Trapo, T. "Host-Dependent Tumorigenesis of Embryonic Stem Cell Transplantation in Experimental Stroke". *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23, (2003), 780–785.

¹⁶ Arnhold, S., Lenartz, D., Kruttwig, K., Klinz, F.J., Kolossov, E., Hescheler, J., Sturm, V., Andressen, C., Addicks, K. "Differentiation of green fluorescent protein-labeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum". *J Neurosurg* 93, (2000), 1026–1032; Brustle, O., Jones, K.N., Learish, R.D., Karam, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D.,

Por ello, aunque se ha abordado el empleo de células troncales de origen embrionario para probar tratamientos en animales de experimentación, la utilización terapéutica de células troncales embrionarias es, en estos momentos, sólo una hipótesis de investigación¹⁷.

a) El área en que se han llevado a cabo los experimentos en modelos animales es fundamentalmente neuronas o precursoras de ellas. Se ha descrito la obtención de células neurales derivadas de ES que, transplantadas a modelos murinos de enfermedad de Parkinson, han permitido recuperar la función perdida¹⁸; sin embargo, los datos no son extrapolables a humanos.

En la actualidad hay un sólo trabajo publicado¹⁹ de transferencia de células de origen embrionario a primates (un modelo de la enfermedad de Parkinson). En él se pone de manifiesto que las células transferidas tienen un efecto positivo a breve plazo pero no se puede descartar la posibilidad de formación de tumor.

En modelos murinos²⁰ se han realizado diversos trabajos. En rata se han conseguido neuronas motoras derivadas de ES modificadas genéticamente con la introducción del gen MASH1, que codifica un factor de transcripción requerido para el desarrollo de neuronas. La transferencia de estas neuronas modificadas a animales denervados (hemipléjicos) restaura la

McKay, R.D.G. "Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants". *Science* 285, (1999), 754–756; Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M.F., Reinhartz, E., Itzik, A., Ben-Hur, T. "Neural progenitors from human embryonic stem cells". *Nat Biotechnol* 19, (2001), 1134–1140; Kim, J.H., Auerbach, J.M., Rodriguez-Gomez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., McKay, R. "Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease". *Nature* 418, (2002), 50–56; Zhang, S.C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brustle, O., Thomson, J.A. "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells". *Nat Biotechnol* 19, (2001), 1129–1133.

¹⁷ Se han dado directrices por parte de la Unión Europea para asegurar que el uso terapéutico de las ES tenga los requisitos estándar de calidad (2004/23/EC; más información en <http://europa.eu.int/eur-lex/en/>). Después de derivar las líneas celulares es necesario confirmar que no han sufrido alteraciones cromosómicas y que mantienen la adecuada capacidad de diferenciación.

¹⁸ Bjorklund, L.M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.S., Isacson, O. "Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, (2002), 2344–2349; Kim, J.H., Auerbach, J.M., Rodriguez-Gomez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., McKay, R. "Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease". *Nature* 418, (2002), 50–6.

¹⁹ Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H., Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh, N., Nakatsuji, N., Sasai, Y., Hashimoto, N. "Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model". *J. Clin. Invest.* 115, (2005), 102–109.

²⁰ McDonald, J.W., Liu, X.Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S.K., Turetsky, D., Gottlieb, D.I., Choi, D.W. "Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord". *Nat. Med.* 5, (1999), 1410–1412; Chiba, S., Iwasaki, Y., Sekino, H., Suzuki, N. "Transplantation of motoneuron-enriched neural cells derived from mouse embryonic stem cells improves motor function of hemiplegic mice". *Cell Transplant* 12, (2003), 457–468.

función²¹. Se desconoce la estabilidad del injerto, pero en este caso claramente no se ha observado producción de teratomas.

El trasplante de ES murinas heterólogas, incluso no prediferenciadas, permite que las ES migren a la zona cerebral con infarto de una rata, se diferencien a precursores y que no induzcan formación de tumores. Estos resultados no se dan en el caso de trasplante homólogo (ocurren tumores malignos en el sitio del implante y las células no migran²²) por lo que se supone que sea debido a un efecto supresor de tumor por parte de la región dañada del huésped²³.

b) Se había descrito por diversos autores la posibilidad de inyectar a ratones células productoras de insulina, derivadas de las ES, capaces de realizar la corrección de la diabetes²⁴ en ratón, durante un breve periodo de tiempo. Sin embargo, las células secretoras de insulina derivadas de ES no son productoras de la hormona; como se puso posteriormente de manifiesto estas células captaban la insulina del medio de cultivo²⁵.

c) Recientemente, se ha conseguido corregir parcialmente la falta de factor IX de coagulación en ratón con células ES cultivadas *in vitro* para dar precursores endodérmicos putativos²⁶. Sin embargo, algunos de los animales desarrollaron teratomas.

d) En 2005 el equipo de Barberi ha logrado la producción de un ilimitado número de precursores mesenquimales (hESMPC) que podrían ser útiles para conocer como se diferencian y para evaluar la aplicación práctica²⁷. Usaron dos líneas de ES indiferenciadas del registro de EE.UU y las cultivaron en un lecho de células de ratón para dar cinco líneas policlonales. El cultivo de estos precursores policlonales produjo células de la grasa, hueso, cartílago, y músculo. Expresan genes, antígenos de superficie y proteínas típicas del tejido y no se han encontrado marcadores de células inmaduras; parece, por tanto, que no quedan células residuales con potencial tumoral.

²¹ Ikeda, R., Kurokawa, M.S., Chibaa, S., Yoshikawa, H., Hashimoto, T., Tadokoroc, M., Suzukia, N. "Transplantation of motoneurons derived from MASH1-transfected mouse ES cells reconstitutes neural networks and improves motor function in hemiplegic mice". *Experimental Neurology* 189, (2004), 280–292.

²² Erdö, F., Bührle, Ch., Blunk, J., Hoehn, M., Xia, Y., Fleischmann, B., Föcking, M., Küstermann, E., Kolossov, E., Hescheler, J., Hossmann, K.A., Trapp, T. "Host-Dependent Tumorigenesis of Embryonic Stem Cell Transplantation in Experimental Stroke". *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23, (2003), 780–785.

²³ Hoehn, M., Küstermann, E., Blunk, J., Wiedermann, D., Trapp, T., Wecker, S., Föcking, M., Arnold, H., Hescheler, J., Fleischmann, B.K., Schwindt, W., Bührle, C. "Monitoring of implanted stem cell migration *in vivo*: a highly resolved *in vivo* magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat". *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, (2002), 16267–16272.

²⁴ Soria, B., Roche, E., Berna, G. et al. "Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice". *Diabetes* 49, (2000), 157-162.

²⁵ Rajagopal, J., Anderson, J., Kume, S., Martinez, O.I., Melton, D.A. "Insulin Staining of ES Cell Progeny from Insulin Uptake". *Science* 299, (2003), 363.

²⁶ Fair, J. et al. PNAS. (2005), DOI: 10.1073/pnas.0409840102.

2.3. Los embriones preimplantatorios como fuente de obtención de las “células madre de origen embrionario”.

a) Para la obtención de células ES se han usado blastocistos humanos de unos 5 a 8 días fecundados *in vitro*, e inicialmente excedentes de la práctica de estas técnicas. Estos embriones (vivos o muertos) se desintegran para tomar de ellos las células que componen la masa interna celular. Las células hES se han inmortalizado como líneas celulares²⁸. La tasa de producción de células hES y sus características han resultado ser dependientes de la calidad de los blastocistos, de las condiciones de aislamiento y de la experiencia del grupo. El equipo de Stojkovic, ya citado, ha tratado de cultivar blastocistos para obtener embriones tempranos con una masa celular interna bien formada, modificando el protocolo de cultivo de los embriones vivos. Cambiando el medio en el día 3 y pasándole, en el día 6, a un medio condicionado (cuyos componentes desempeñan un importante papel en la embriogénesis temprana), se produce la eclosión en el día 8 y el embrión de esa edad posee células maduras. En el día 9 comienza a formar un polo similar al cono de implantación aunque la masa interna no forma la estructura bilaminar en disco propia de un embrión en su segunda semana de desarrollo²⁹.

Las células hES se han obtenido también de embriones de menos de 5 días, concretamente en el estado de mórula³⁰.

Generalmente no se tiene en cuenta si los embriones están vivos o muertos, o en que momento se han destruido. Tanto si han estado crioconservados, o no, se cultivan en medios adecuados para permitir que continúe su desarrollo *in vitro* y posteriormente, por diferentes procedimientos, se desagrega el embrión y se cultivan las células. El cultivo del embrión crioconservado incluye la reanimación de la vida detenida por efecto de la temperatura. Toda investigación, sea cual sea el fin que persiga, que parta de embriones carece de justificación ética. Los embriones generados *in vitro* no mueren de forma natural puesto que no están en el entorno adecuado, la madre, para la óptima supervivencia y desarrollo. Se tratará siempre de un riesgo de muerte consentido, aunque no sea ni buscado ni querido directamente.

No obstante, desde el punto de vista moral no tiene la misma gravedad aprovechar los cadáveres de embriones injustamente muertos, que destruir embriones vivos. En el primer

²⁷ Barberi, T., Willis, L.M., Succi, N.D., Studer, L. "Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells". *PLoS Medicine*. | www.plosmedicine.org 2, 6l (2005), e161 0559.

²⁸ cfr. por ejemplo Cowan, C.A., et al. "Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts". *N. Engl. J. Med.* 350, (2004), 1353-1356.

²⁹ Fong, C.Y., Sathananthan, H., Wong, P.C., Bongso, A. "Nine-day-old human embryo cultured in vitro: a clue to the origins of embryonic stem cells". *Reproductive BioMedicine Online* 9, (2004), 321-325.

³⁰ Strelchenko, N., et al. "Morula-derived human embryonic stem cells". *Reprod.BioMed.* 9, (2004), 623-629.

caso es una cooperación voluntaria a un mal, no asimilable simplemente al uso de cadáveres humanos como fuente de órganos para transplantes. Es un mal menor que la destrucción directa de los embriones vivos, pero un mal.

Esta cuestión remite a otras dos. En primer lugar, al criterio para detectar si ha acaecido la muerte. El concepto de muerte para el embrión, como para el adulto, es obviamente la pérdida irreversible de la capacidad de funcionamiento armónico y coordinado como unidad. En el embrión precoz la muerte se pone de manifiesto en la pérdida de la capacidad de continuar el ritmo de división celular y el crecimiento unitario siguiendo la organización estructural correspondiente al tiempo de vida. Son parámetros observables.

En segundo lugar, se plantea la duda acerca de si las blastómeras, aisladas del embrión precoz, pudieran adquirir con el cultivo y manipulación *in vitro* carácter totipotencial y generar un nuevo individuo. Es decir, si se da o no, en las condiciones de una manipulación concreta, una gemelación múltiple artificial que generase un nuevo embrión, que sería destruido a continuación. Los datos existentes de experimentos con animales permiten conocer las condiciones necesarias para que producir una gemelación múltiple. Las blastómeras se multiplican *in vitro*³¹ y una blastómera puede hacerse totipotente y desarrollarse como embrión³², e incluso proseguir un desarrollo postimplantatorio³³ en condiciones muy precisas; concretamente se ha conseguido en animales con un lecho con proteínas de matriz extracelular. Las condiciones requeridas son muy diferentes a las condiciones en las que esa célula crece en cultivo y se multiplica con posibilidad de madurar hacia célula ES. Son dos procesos bien diferentes que ocurren en condiciones diferentes y que permiten diferenciar qué se está haciendo y con ello la licitud o no de llevarlo a cabo.

b) Se ha propuesto usar embriones deficientes, concretamente triploides, como fuente de obtención de células hES. A veces una fecundación acaba en un cigoto triploide y, tanto si el pronúcleo en exceso proviene de gameto materno como si proviene del paterno, la gestación

³¹ Wilton, L., Trounson, A. "Biopsy of preimplantation mouse embryos: development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres *in vitro*". *Biol. Reprod.* 40, (1989), 145-152.

³² Tao, T., Niemann, H. "Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8- and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured *in vitro*". *Hum. Reprod.* 15, (2000) 881-889; Saito, S., Niemann, H. "Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres". *Biol. Reprod.* 44, (1991), 927-936

³³ Rossant, J. "Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs". *J. Embryol. Exp. Morphol.* 36, (1976), 283-290; Moore, N.W., Adams, C.E., Rowson, L.E. "Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg". *J. Reprod. Fertil.* 17, (1968), 527-531; Willadsen, S.M. "The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos". *J. Embryol. Exp. Morphol.* 15, (1981), 165-172; Menino, A.R., Wright, R.W. "Effect of pronase treatment, microdissection, and zona pellucida removal on the development of porcine embryos and blastomeres *in vitro*". *Biol. Reprod.* 28, (1983), 433-446. Niemann, H., Reichelt, B. "Manipulating early pig embryos". *J. Reprod. Fertil.* 48, (1993), 75-94; Chan, A.W.S., et al "Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting". *Science* 287, (2000), 317-319.

no llega a término por un cúmulo de malformaciones; los fetos son abortados espontáneamente ya que de suyo no son viables³⁴. En la práctica de la FIV, el 4% de los óvulos inseminados tienen esta anomalía; se han llevado a cabo experimentos encaminados a eliminar el pronúcleo excedente, restaurando de esta forma el estado diploide heteroparental de la fecundación normal; argumentan que dado que *legalmente* no se puede implantar en el útero un embrión manipulado, estos embriones humanos “desechables” una vez normalizados (es decir, curados) podrían usarse como fuente de células ES. Obviamente no es lícito éticamente.

2.4 Obtención de las “células madre de origen embrionario” de una biopsia del embrión.

La tecnología utilizada para obtener una muestra con la que hacer el diagnóstico genético preimplantatorio (PGD) ha mostrado que es posible sacar una o dos blastómeras del embrión de 3 días y que éste prosiga posteriormente su desarrollo³⁵. Este análisis de PGD pretende detectar embriones bien genéticamente ‘anormales’, o que presenten predisposición genética a algún tipo de tara, para desecharlos. Algunos datos apuntan a que de los embriones desechados como anormales, se puedan obtener células ES normales. De hecho algunas alteraciones parecen corregirse en el desarrollo temprano³⁶.

Un trabajo reciente³⁷ muestra la obtención de células ES de ratón desde una sola blastómera sacada de un embrión de ratón de ocho células y que esa manipulación no afecta al desarrollo. El trabajo lo dirige Robert Lanza y la difusión a los medios de comunicación se sitúa de pleno en la línea de lo que se ha llamado la “obsesión por las células madre embrionarias”. Forma parte de las campañas dirigidas a conseguir fondos públicos de la administración Bush de las que Robert Lanza es uno de los promotores. Esta propuesta ni tiene utilidad ni resuelve el problema ni técnico ni ético del uso de embriones para terapia regenerativa. La técnica de obtener células madre embrionarias desde una sola célula sacada al embrión de ocho no está validada, ni está asegurado que la biopsia no afecte al embrión. Más aún ¿puede pensarse seriamente que una clínica de FIV ofrezca biopsias de los embriones en cultivo preparados para transferirlos a su madre?

³⁴ Daniel, A., et al. "Karyotype, phenotype and parental origin in 19 cases of triploidy". *Prenat Diagn* 21, (2001), 1034-1048.

³⁵ Handyside, A.H., et al. "Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification". *Nature* 344, (1990), 768-770; Staessen, C., et al. "Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial". *Hum. Reprod.* 19, (2004), 2849-2858.

³⁶ Check, E. "Biologists forced to reassess embryo test". *Nature* 437, (2005), 1075.

Es obvio que una intervención de riesgo, como ésta, para investigar un potencial beneficio futuro de terceros no puede estar justificada ni legal ni éticamente. Incluso, si se plantease como objetivo guardarlas en un banco de células autólogas por si el propio embrión las necesitara después, no deja de formar parte de esa gran falacia vertida a la sociedad: las células madre de origen embrionario ni sirven para curar ni son necesarias para curar.

En conclusión, una investigación que parta de embriones humanos, sea cual sea el estado de éstos, no está justificada éticamente puesto que no va en beneficio de la vida y salud del propio embrión. Y además no es racional desde el punto de vista científico-técnico.

3. Obtención y potencial uso terapéutico de células madre del tipo embrionario.

Inicialmente se planteó la obtención de células madre de origen embrionario con dotación genética del paciente mediante la tecnología de la clonación de individuos a fin de evitar los problemas de rechazo inmunológico cuando las células fuesen transferidas al enfermo³⁸. Más tarde se ha visto que no es necesario para ello obtener un individuo humano clónico en estado embrionario; esto es, que la tecnología usada para clonar una oveja o un perro no es suficiente para clonar un individuo primate.

3.1. Obtención de las células madre del tipo embrionario desde óvulos reconstruidos por transferencia nuclear.

Distinguimos el término *embrión gamético* (generado por fecundación de gametos) de *embrión partenogénico* (obtenido por activación de un óvulo) y de *embrión somático* (obtenido por transferencia del núcleo de una célula somática a un óvulo desnucleado). El primero es un individuo de la especie sea cual sea el origen, natural o artificial, de la fusión de los gametos. El segundo no es un verdadero embrión, sino lo que se ha denominado habitualmente “mola” o “huevo huero”. La realidad del tercero depende de que se haya conseguido, o no, una reprogramación del material genético desde el estado maduro de la célula somática donadora hacia el estado totipotente del genoma del cigoto, lo cual a su vez depende de la especie de mamífero de que se trate.

Del “producto artificial” obtenido en los dos últimos casos por manipulación del gameto femenino es posible aislar “células madre del tipo embrionario”, con características de célula inmadura y con dotación genética de óvulo o de célula somática. Y en ambos se requieren óvulos humanos como material de partida.

³⁷ Cheng, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S.J., Jonson, J., Meisner, L., Lanza, R. "Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres". *Nature*, (2005), doi:10.1038/nature04277.

³⁸ Rhind, S.M., Taylor, J.E., De Sousa, P.A., King, T.J., McGarry, M. & Wilmut, I. "Human cloning: can it be made safe?" *Nature Review Genetics* 4, (2003), 855–864.

3.1.1. Transferencia nuclear

Se trata de conseguir células troncales del tipo embrionario (ntES) mediante la tecnología de transferencia nuclear desde una célula somática, más o menos indiferenciada, a un óvulo desnucleado. En este tipo de manipulación es esencial distinguir de qué especie se trata, para conocer cual es la entidad del “artefacto” conseguido. Una clonación requiere la transferencia nuclear más la reprogramación para alcanzar un individuo en estado embrionario o a término del desarrollo. Tal reprogramación es muy diferente según la especie de mamífero de que se trate.

Por el momento se han obtenido clones desde células de adulto de siete especies de mamíferos, con la notable excepción de primates³⁹. En primates no humanos y en humanos, sin una reprogramación adecuada, no se ha llegado a obtener un individuo en estado embrionario sino agrupaciones celulares o *estructuras embrioides*. Algunas de las células que forman esas agrupaciones expresan los genes propios de las células troncales de origen embrionario puesto que derivan de la multiplicación de un óvulo activado, que se comporta en algunos aspectos de forma semejante a un óvulo fecundado. Sin embargo, carece de la organización unitaria de un individuo. No hay en marcha un principio vital que integre de forma coordinada el desarrollo; no se ha puesto en marcha el programa de desarrollo debido al estado del genoma procedente de la célula somática.

La eficacia de la clonación de un mamífero es muy baja. La falta de éxito se debe a pérdidas en las etapas tempranas de desarrollo y también a pérdidas en los estadios pre- y perinatal, debidas a anormalidades en la placenta, y problemas inmunológicos, respiratorios o renales⁴⁰. La razón principal, tanto de la baja eficiencia en el desarrollo como de la presencia de anormalidades, es la expresión alterada de una serie de genes por fallo del proceso de metilación del DNA⁴¹ que origina una incompleta reprogramación del DNA del núcleo

³⁹ National Academy of Sciences (2002) *Scientific and Medical Aspects of Human Reproductive Cloning* Natl. Acad. Press, Washington, DC.

⁴⁰ Renard, J.P., Chastant, S., Chesne, P., Richard, C., Marchal, J., Cordonnier, N., Chavatte, P., Vignon, X. "Lymphoid hypoplasia and somatic cloning". *Lancet* 353, (1999), 1489-1491; Hill, J.R., Burghardt, R.C., Jones, K., Long, C.R., Looney, C.R., Shin, T., Spencer, T.E., Thompson, J.A., Winger, Q.A., Westhusin, M.E. "Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses". *Biology of Reproduction* 63, (2000), 1787-1794; Kubo, M. "Pathology of diseases in calves cloned by nuclear transfer". *Proceedings of the International Workshop on Current Status and Perspectives in Cloning and Related Studies*, (2001); pp. 8; Tanaka, S., Oda, M., Toyoshima, Y., Wakayama, T., Tanaka, M., Yoshida, N., Hattori, N., Ohgane, J., Yanagimachi, R., Shiota, K. "Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer". *Biology of Reproduction* 65, (2001), 1813-1821.

⁴¹ Rideout, W.M., Eggan, K., Jaenisch, R. "Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome". *Science* 293, (2001), 1093-1098; Lee, J. "Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells". *Development* 129, (2002), 1807-1817; Mager, J., Montgomery, N.D., Pardo, M., de Villena, F., Magnuson, T. "Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed". *Nature*

donante; esto es, la transferencia de un núcleo a un oocito no logra en muchos casos la reprogramación del mensaje genético. La activación de un óvulo reconstruido o un nuclóvulo no siempre acaba en un cigoto; y por ahora no se ha logrado que ocurra en ninguno de los más de mil intentos realizados con primates.

Por ahora, la técnica de transferencia nuclear sin verdadera reprogramación, aplicada a primates, supone la obtención de células madre del tipo embrionario sin generar un individuo. Ahora bien, esta tecnología no aprueba otros exámenes técnicos ni éticos. Por una parte, cabría teóricamente la posibilidad de que algún caso se diera accidentalmente la generación de un individuo clónico. Por otra parte, la tasa de obtención de células ntES es muy baja y por ello además de problema técnico origina el problema ético del uso de óvulos humanos. Además, los datos disponibles no permiten garantizar un posible uso terapéutico de estas células. Nos situamos pues en un campo de investigación interesante sin duda, pero no en la órbita de tratamientos médicos a un plazo razonable. Y a un precio implanteable.

Los datos disponibles de obtención y uso de células ntES son los siguientes. En ratón, un mamífero que pudo ser clonado en 1998⁴², se han aislado tras una transferencia nuclear⁴³ y se han usado para tratamiento terapéutico en animal modelo⁴⁴, que no es extrapolable a humanos. En primates, tras cerca de 800 intentos, no se ha conseguido la reconstrucción del embrión, ni del oocito⁴⁵.

Un primer experimento de transferencia de núcleos procedentes de fibroblastos de la piel o de células del *cumulus oophorus* a oocitos humanos⁴⁶ no tuvo eficacia: ninguna de las células obtenidas mostró capacidad de desarrollo embrionario⁴⁷. Se partió de 71 óvulos de 7 mujeres jóvenes, que tuvieron al menos un hijo biológico y de ellos usaron 57 que eran maduros. El

Genetics 33, (2003), 502-507; Rideout, W.M., Eggan, K., Jaenisch, R. "Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome". *Science* 293, (2001), 1093-1098.

⁴²Wakayama, T., Perry, A.C.F., Zuccotti, M., Johnson, K.R., Yanagimachi, R. *Nature* 394, (1998), 369-374; Wakayama, T., Tabar, V., Rodriguez, I., Perry, A.C.F., Studer, L., Mombaerts, P. "Differentiation of Embryonic Stem Cell Lines generated from Adult somatic Cells by Nuclear Transfer". *Science* 292, (2001), 740-743. En ratón el equipo de Rudolf Jaenisch ha conseguido en 2004 clones derivados del núcleo de una neurona olfatoria (*Nature* (2004), DOI: 10.1038/nature02375).

⁴³Munsie, M.J., Michalska, A.E., O'Brien, C.M., Trounson, A.O., Pera, M.F., Mountford, P.S. *Curr. Biol.* 10, (2000), 989-992.

⁴⁴Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. *N. Engl. J. Med.* 349, (2003), 275-286; Mombaerts, P. "Therapeutic cloning in the mouse". *PNAS*, 100, (2003), 11924-11925; Barberi, T., Klivenyi, P., Calingasan, N.Y., Lee, H., Kawamata, H., Loonam, K., Perrier, A.L., Bruses, J., Rubio, M.E., Topf, N., Tabar, V., Harrison, N.L., Beal, M.F., Moore, M.A., Studer, L. "Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice". *Nature Biotechnology* 21, (2003), 1200-1207.

⁴⁵Simerly, C., Dominko, T., Navara, C., Payne, C., Capuano, S., Gosman, G., Chong, K.Y., Takahashi, D., Chace, C., Compton, D., Hewitson, L., Schatten, G. "Molecular correlates of primate nuclear transfer failures". *Science* 300, (2003), 297.

⁴⁶Cibelli, J.B., Kiessling, A.A., Cunniff, K., Richards, C., Lanza, R.P., West, M.D. "Somatic cell nuclear transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development". *J. of Regenerative Medicine* 2, (2001), 25-32.

⁴⁷Adam, D. "First human clones get a cool response". *Nature* 414, (2001), 477.

equipo de investigadores de Corea del Sur, en asociación con Cibelli de la ACT, consiguió en 2004 una línea celular de células madre del tipo embrionario de mujer⁴⁸. En el segundo experimento, publicado en mayo de 2005, mejoran la técnica al usar óvulos de chicas más jóvenes y consiguen un mayor rendimiento⁴⁹: 11 líneas celulares algunas de ellas con el núcleo de célula somática de varón con enfermedades de la sangre, diabetes, o daño de la médula espinal. Si en el primer trabajo el rendimiento fue de una línea por 230 intentos, en el segundo fue de una de cada 15. Este dato parecía de interés; mostraría que la capacidad de que algunas células alcancen características de célula del tipo embrionario es dependiente de la “calidad” del óvulo usado; lo que apoya que el constructor resultante de la transferencia nuclear requiere componentes del citoplasma para multiplicarse y expresar genes de células embrionarias con independencia de la información del núcleo que no es la de un cigoto, sino la correspondiente a una célula somática: no se requiere reprogramación de la información para obtener hntES sino inducir un crecimiento con interacciones celulares “similares” a las del inicio del desarrollo embrionario. Ahora bien en diciembre de 2005 la revista Nature ha sacado a la luz un escándalo que se suma al producido semanas antes por la manipulación de mujeres para la obtención de sus óvulos y que costó la dimisión de Hwang como Director de la Fundación Mundial de Células Madres con sede en Corea del Sur. En efecto, la revista Science que publicó el trabajo en Mayo, se vio obligada a rectificar los datos enviados por Hwang: la figure que muestra los patrones de expresión de marcadores específicos de células troncales de tipo embrionario de las 11 líneas contiene 4 pares de imágenes duplicadas. Una segunda corrección sustanciosa es la table que mostraba que todas las células habían pasado la prueba de comprobar si eran del tipo embrionario y sólo tres de las once la habían pasado. Mas aún, Gerald Schatten de la Universidad de Pittsburgh en Pennsylvania, que firmaba el artículo se ha distanciado. Una nota adicional de la revista describe que el papel jugado por los autores de la Universidad de Pittsburgh en los siguientes términos: “se ha limitado a la revisión y análisis de datos anónimos y ayuda en la preparación del manuscrito”. Es posible que los resultados de la investigación puedan validarse e incluso que quepa un error, en parte no intencionado, pero los intereses extracientíficos son muy graves y la mentira en la investigación no debe ser tolerada.

⁴⁸ Hwang, W.S., Ryu, Y.J., Park, J.H., Park, E.S., Lee, E.G., Koo, J.M., Jeon, H.Y., Lee, B.C., Kang, S.K., Kim, S.J., Ahn, C., Hwang, J.H., Park, K.Y., Cibelli, J.B., Moon, S.Y. "Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst". *Science* 303, (2004), 1669–1674.

3.1.2. Transferencia nuclear alterada (ANT)

La idea de modificar la técnica de transferencia nuclear (un procedimiento conocido como “Transferencia nuclear alterada”, ANT) fue sugerida por Hurlbut⁵⁰ como una forma “éticamente aceptable” de conseguir células madre del tipo embrionario creando un embrión clónico deficiente y por ello incapaz de implantarse en la madre. La premisa de esta propuesta es inactivar un gen crucial para el desarrollo. Jaenisch aceptó la propuesta de comprobar si de un ratón clónico deficiente podrían obtenerse células ntES capaces de diferenciarse y madurar inactivando un gen imprescindible para generar el trofoectodermo. La prueba en ratón ha tenido éxito.

La estrategia ha consistido en: 1) modificar el material genético del núcleo de una célula de ratón recién nacido, en concreto de una célula inmadura de la piel, mediante lo que se denomina “interferencia con RNA”; es decir, han introducido un RNA que es copia complementaria de un gen, el gen llamado Cdx2, con lo que se consigue bloquear su expresión; 2) a continuación ese núcleo alterado, con un gen que no puede expresarse, se transfiere a un óvulo desnucleado y se activa el óvulo reconstruido para que inicie el proceso de desarrollo de un clón que será “deficiente”. La deficiencia consiste en que cuando llega a la fase de ocho células necesitaría usar ese gen que le han bloqueado a fin de producir las células que forman la envoltura (el llamado trofoblasto) imprescindible para anidar en un útero y formar la placenta. Sin embargo, las otras células que van a dar la masa interna, y de las que pueden derivarse las células madre embrionarias no necesitan este gen y son normales. De un total de 526 óvulos a los que se les ha transferido un núcleo de célula inmadura y de ratón recién nacido, 61 han avanzado el desarrollo hasta los estados en que poseen las células deseadas, el estado de mórula y de blastocisto, de las que es posible obtener células madre del tipo embrionario con la dotación genética del ratón elegido como donador del núcleo.

La tecnología de ANT es una simple variante de la transferencia nuclear y no una alternativa que resuelva el dilema ético de una posible clonación humana para destruir el clón y usar sus células. Es decir, si hipotéticamente los procedimientos actuales de transferencia nuclear dieran accidentalmente en algún caso un verdadero embrión humano clónico, la alteración nuclear no impediría que se generase, sino sólo conseguiría malformar al embrión haciéndolo

⁴⁹ Wang, et al. "Patient-Specific Embryonic Stem Cells Derived from Human SCNT Blastocysts". *Science* 308, (2005),1777-1783. Al mismo tiempo el equipo de Miodrag Stojkovic describía en la revista *Reproductive&Biomedicine Online*, una transferencia nuclear dirigida a obtener células ntES humanas.

⁵⁰ Hurlbut, W.B. "Altered nuclear transfer as a morally acceptable means for the procurement of human embryonic stem cells". *Perspect. Biol. Med.* 48, (2005), 211-228.

inviabile. Como el propio Jaenisch ha publicado⁵¹, y repite en este artículo, los datos disponibles muestran que la simple transferencia nuclear no es suficiente en el caso de humanos, y de los demás primates, para generar un verdadero embrión clónico. Por ello, si la tecnología de ANT diera un embrión enfermo e inviabile pero embrión, tendría por tanto la misma carga moral que la clonación terapéutica. La cuestión ética respecto a la transferencia nuclear sigue siendo la misma⁵² y añade otras nuevas debidas a la manipulación.

Por una parte, no se sabe si el bloque de un gen como el CDX2 tiene en humanos el mismo efecto de impedir la implantación que en el ratón⁵³. Habría que comprobarlo en primates ¿o se va a probar la implantación de embriones deficientes, o rarezas celulares, en mujeres? También habría que asegurar que no se corre el riesgo de que la manipulación genética conlleve otros riesgos añadidos. Las características biológicas y moleculares con relación a su posible uso terapéutico son las mismas que las de las células derivadas de embriones procedentes de una fecundación⁵⁴. Sin embargo, en este caso aparece un nuevo factor de riesgo: el uso de vectores retrovirales para la inserción del gen da la posibilidad de mutagénesis y activación de oncogenes que induzcan leucemia⁵⁵, aunque la posibilidad sea realmente remota.

3.2. La activación partenogénica de un óvulo permite producir células del tipo de las troncales embrionarias.

Los óvulos de mamíferos pueden activarse artificialmente⁵⁶ empleando una variedad de estímulos y originar células diploides, por inhibir la eliminación del segundo cuerpo polar, o induciendo su entrada después de la expulsión. Se conoce que los óvulos partenogénicos de mamíferos no llegan a desarrollarse a término como un embrión: no lo son de hecho. La

⁵¹ Jaenisch, R. "Human cloning, the science and ethics of nuclear transplattation". *N. Engl. J. Med.* 351, (2004), 2787-2791.

⁵² The President's Council on Bioethics. Alternative sources of human pluripotent stem cells. [Online] <http://www.bioethics.gov> (2005); Melton, D.A., Daley, G.Q., Jennings, C.G. "Altered nuclear transfer in stem-cell research—a flawed proposal". *N. Engl. J. Med.* 351, (2004), 2791-2792.

⁵³ Adjaye, J. et al. "Primary differentiation in the human blastocyst: Comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells". *Stem Cells* (2005), doi:10.1634/stemcells.2005-0113; Hyslop, L.A. et al. "Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages". *Stem Cells* 23, (2005), 1035-1043.

⁵⁴ Brambrink, T., Hochedlinger, K., Jaenisch, R. "Gene expression in embryonic stem cells from cloned and fertilized embryos". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2005), (submitted).

⁵⁵ Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y., Verma, I.M., "Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, (2002), 2140-2145; Hacein-Bey-Abina, S., et al. "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1". *Science* 302, (2003), 415-419.

⁵⁶ Ozil, J.P. "The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation". *Development* 109, (1990), 117-127; Vitullo, A.D., Ozil, J.P. "Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation". *Developmental Biology* 151, (1992),

activación de un óvulo se distingue de la realidad cigoto principalmente en que carece de la impronta paterna del genoma. Esto ha quedado claramente esclarecido cuando ha llegado a nacer un ratón de una “partenogénesis más reprogramación”: reconstruyen un cigoto sobre la base de mezclar la dotación genética haploide normal de un óvulo y la de otro al que modifican la impronta para cambiarla de materna a paterna⁵⁷.

Sin embargo, las células partenogénicas son capaces de diferenciarse hacia células madre del tipo embrionario. Así, la división de oocitos activados ofrece una vía de obtención de células madre embrionarias. En el año 2002 se realizó el experimento de inducir a división oocitos de Macaco y las células obtenidas, del tipo ES se immortalizaron como líneas celulares y posteriormente se convirtieron en neuronas, células musculares o grasas⁵⁸.

3.3. La cuestión de los óvulos humanos y alternativas.

En cualquier caso estas tecnologías, que pueden aportar células madre embrionarias sin crear ni destruir embriones, parten de óvulos humanos, lo que supone una manipulación injustificada de mujeres, sometidas a un tratamiento de hiperovulación para ser donantes. Además una investigación, o posibles procedimientos terapéuticos, partiendo de tal material es muy poco realista⁵⁹.

Para obviar esta dificultad el equipo de Guisen Sheng de China ha hecho la transferencia del núcleo de una célula somática humana al oocito desnucleado de coneja⁶⁰. Aunque no se trate de una célula híbrida y mucho menos de un híbrido hombre-animal, para algunos, mezclar material humano con el de otra especie, resulta ofensivo. En todo caso, está por averiguar si las células crecen a largo plazo y si el material genético mitocondrial del óvulo animal es compatible con el nuclear humano.

4. La fusión celular como sistema de rejuvenecimiento de células somáticas al tipo embrionario.

La fusión celular se sitúa en la línea de investigación que tiene como objetivo conseguir células madre que lleven los genes de un enfermo; sería una alternativa a la transferencia

128-136; Ozil, J.P., Huneau, D. "Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca²⁺ signal regime on development". *Development* 128, (2001), 917-28.

⁵⁷ Kono, T., Obata, Y., Wu, Q., Niwa, K., Ono, Y., Yamamoto, Y., Sung-Park, E., Seo-Jeong, Sun, Ogawa, H. "Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood". *Nature* 428, (2004), 860-864.

⁵⁸ Cibelli, J.B., Grant, K.A., Chapman, K.B. et al. *Science* 295, (2002) 819, Vrana, K.E., Hipp, J.D., McCool, B.A. et al. "Nonhuman primate parthenogenetic stem cells". *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100, (2003), 11911-11916.

⁵⁹ Birmingham, K. "The move to preserve therapeutic cloning". *Journal of Clinical Investigation* 112, (2003), 1600-1601.

⁶⁰ Chen, et al. *Cell Res* 13, (2003), 251-263; Solter, D. "New paths to human ES cells?" *Nature Biotechnology* 21, (2003), 1154-1155.

nuclear que no requiere usar óvulos. Estas células serían útiles podría estudiar en qué medida defectos de algunos genes causan la enfermedad y en qué momento del desarrollo embrionario del paciente se manifiestan; a largo plazo, esas células madre compatibles, pudieran hipotéticamente transferirse al paciente para sustituir, en algún caso, a las destruidas por la enfermedad.

Se ha logrado “rejuvenecer” células de la piel mediante su fusión con células madres obtenidas a partir de embriones⁶¹. La célula híbrida formada mantiene la dotación genética de las dos. El análisis muestra que el material genético de la célula de la piel se reprograma con los componentes de la célula embrionaria de manera que la célula mixta adquiere propiedades de célula madre del tipo embrionario: se multiplica, adquiere el carácter pluripotente, forma conglomerados celulares iguales cuando crecen en el laboratorio que maduran y se diferencian hacia células de los tres tejidos que constituyen un embrión en desarrollo. Esto es debido a que expresa los genes de la pluripotencialidad, que avisan a la célula para que permanezca joven y con posibilidad de seguir el camino que se le marque desde fuera, a diferencia de las células de la piel. El trabajo es aún preliminar, ya que no se ha podido retirar el DNA de la célula madre embrionaria. Habrá que ver si es factible y, si una vez eliminado, la célula mixta conserva el estado reprogramado. La fusión celular no es fácil desde el punto de vista técnico; en este experimento se han requerido varios millones de células madre embrionarias, que a su vez proceden de embriones destruidos. No estaría por tanto, justificado como procedimiento ya que sigue siendo una investigación consumidora de embriones.

En esta misma línea se han reprogramado células inmaduras NSCs por fusión con ES mediante fusión⁶².

Ahora bien, los experimentos de fusión abren otras perspectivas. Se podría tratar de rejuvenecer la célula introduciendo en ella los componentes moleculares que efectúan la reprogramación y que están presentes en otras células madre muy jóvenes de adulto. De hecho, con anterioridad se había conseguido reprogramar fibroblastos humanos⁶³ inyectándoles el citosol de linfocitos T; las células reprogramadas responden y funcionan como linfocitos T.

En conclusión, las técnicas que permitan obtener células madre del tipo embrionario y con dotación genética específica, sin usar embriones ni óvulos humanos, se presentan como los

⁶¹ Cowan, Ch.A., Atienza, J., Melton, D.A., Eggan, K. "Nuclear Reprogramming of Somatic Cells After Fusion with Human Embryonic Stem Cells". *Science* 309, (2005), 1369-1372.

⁶² Do, J.T., Schöler, H.R. "Nuclei of Embryonic Stem Cells Reprogram Somatic Cells". *Stem Cell* 22, (2004), 941-949.

únicos métodos justificables éticamente. En principio, serían tanto la fusión celular entre una célula somática y otra indiferenciada, como la inyección a la célula somática del citoplasma de una célula indiferenciada, o los componentes reprogramadores aislados.

⁶³ Hakelien, A.N., Landsverk, H.B., Robl, J.M., Skalhegg, B.S., Collas, P. "Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts". *Nature biotechnology* 20, (2002), 460-466.